



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 103 37 074 A1-2005.03.17

21

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: 103 37 074.9
(22) Anmeldetag: 12.08.2003
(43) Offenlegungstag: 17.03.2005

(51) Int Cl.: **A61K 38/55**
A61P 25/00

(71) Anmelder:
KeyNeurotek AG, 39120 Magdeburg, DE
(74) Vertreter:
Koepe & Partner Patentanwälte, 80538 München
(72) Erfinder:
Striggow, Frank, Dr., 39120 Magdeburg, DE;
Röhnert, Peter, Dr., 39120 Magdeburg, DE; Mack,
Till, Dr., 39120 Magdeburg, DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:
DE 101 00 053 A1
US 2003/0 14 896 A1
WO 95/34 538 A2
WO 01/54 707 A2

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: Verwendung der Inhibitoren von Enzymen mit Aktivitäten der Amino-peptidase N und/oder der Di-peptidylpeptidase IV und pharmazeutischen Zubereitungen daraus zur Therapie und Prävention von chronischen neurodegenerativen Erkrankungen

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen, bei denen mißgefaltete Proteine in charakteristischen Läsionen akkumulieren und wesentlich zur Pathogenese und zu schadenspotenzierenden inflammatorischen Reaktionen beitragen, durch die alleinige oder gemeinsame Wirkung von Inhibitoren der Alanin-Amino-peptidase (APN) und Di-peptidylpeptidase IV (DP IV). Unsere Erfindung zeigt, dass zur Therapie und Prävention von Demenzerkrankungen und -Zuständen die Applikation von Hemmstoffen der oben genannten Enzyme bzw. von diese Hemmstoffe enthaltenden Zubereitungen und Darreichungsformen daraus geeignet sind.

Brand Name / Generic Code	Drug Class	Launch Date	Market Share (in %)	Strengths	Weaknesses
*Aricept / donepezil	Acetylcholin- esterase inhibitor	1997	72.1	<ul style="list-style-type: none"> Status as a "gold-standard" Once-a-day dosing No liver toxicity 	<ul style="list-style-type: none"> Some mild side-effects including headache, pain, fatigue, nausea, insomnia, etc.
*Exelon / rivastigmine	Acetylcholin- esterase inhibitor	2000	17.3	<ul style="list-style-type: none"> More potent inhibitor of AChE in the cortex and hippocampus few side effects No known drug interactions 	<ul style="list-style-type: none"> Twice-daily dosing regimen Some patients in clinical trials who received higher doses died
*Reminyl / galantamine	Acetylcholin- esterase inhibitor	2001	9.8	<ul style="list-style-type: none"> Dual mechanism of action to maximize cholinergic function 	<ul style="list-style-type: none"> Conclusive evidence of its potential benefit has not yet been proven
AXURA (Eli Lilly) /Memantine	NMDA receptor antagonist	2002 (EU) Phase III (USA)		<ul style="list-style-type: none"> Approved for medium severe AD 	<ul style="list-style-type: none"> no causal treatment

Beschreibung

[0001] Die Erfindung beschreibt die Verzögerung der progressiven Alzheimerspezifischen Neurodegeneration und damit Verbesserungen von pathophysiologischen und kognitiven Parametern durch die Wirkung von Inhibitoren der Amino-peptidase N (APN, EC 3.4.11.2, CD13) oder/und der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV, EC 3.4.14.5, CD26) im Ergebnis der einzelnen, simultanen oder zeitlich unmittelbar aufeinanderfolgenden Applikation von jeweils spezifischen Inhibitoren dieser Enzyme oder von Inhibitoren von Enzymen gleicher Substratspezifität (APN- oder/und DP IV-analoge Enzymaktivität) auf der Basis von Aminosäurederivaten, Peptiden oder Peptidderivaten.

[0002] Es gibt eine Reihe von altersbedingten Demenzerkrankungen, von denen die Alzheimer'sche Demenz eine besonders wichtige Rolle spielt. Im Jahr 2001 waren in den USA, Japan und Westeuropa etwa 6,5 Millionen Menschen davon betroffen. Aufgrund der alternden Bevölkerung ist in den "entwickelten" Ländern mit einer starken Zunahme der Erkrankungen zu rechnen.

[0003] Zur Entstehung der Alzheimer'schen Demenz gibt es verschiedene Hypothesen. Die meisten beruhen auf Befunden, die an Patienten mit familiär vererbter Alzheimer'scher Demenz erhoben worden sind. Es wird allgemein angenommen, dass Störungen bei der Prozessierung von zwei Proteinen, dem Amyloid Precursor Protein und dem tau-Protein, zur Ansammlung von charakteristischen Proteinablagerungen, zu Defiziten in der Neurotransmission und schließlich zum Untergang von Nervenzellen führen.

Stand der Technik

[0004] Zu Behandlung sind bisher fast ausschließlich Therapeutika vom Typ der Acetylcholinesterase-Inhibitoren (AChEIs) zugelassen. Seit August 2002 ist in Deutschland auch der Wirkstoff Memantine (AXURA), ein Antagonist des NMDA-Rezeptors, auf dem Markt (Therapeutic Report Series: The CNS Outlook to 2007, Reuters Business Insight, 2002, siehe Fig. 1).

[0005] AChEIs erhöhen die Konzentration des Neurotransmitters Acetylcholin und führen zu leichten Verbesserungen der kognitiven Leistungen und der Aktivitäten des täglichen Lebens (activities associated with daily living). Sie haben relativ geringe Nebenwirkungen (Magen-Darm) und sind wenig toxisch.

[0006] Durch Behandlung mit AChEIs wird das Fortschreiten der Demenz etwas (0,5 bis 1 Jahr) verzögert; eine kausale Therapie ist jedoch nicht möglich. Zur Behandlung von fortgeschrittenen Krankheitsstadien ist nur Memantine zugelassen. Die Therapie mit

diesem Wirkstoff beruht auf der Annahme, dass eine erhöhte Aktivität des NMDA-Rezeptors bei der Alzheimer-Pathologie beteiligt ist. Die Substanz hat ein gutes Sicherheitsprofil (unter dem Handelsnamen Akatinol seit Jahren bei "Hirnleistungsstörungen" verordnet). Über langfristige Effekte auf den Krankheitsverlauf ist noch nichts bekannt. Ein Einfluss auf die Grunderkrankung kann nicht erwartet werden.

[0007] In der frühen klinischen Prüfung befinden sich mehrere Wirkstoffe mit verschiedenen Wirkprinzipien (siehe Fig. 1). Inwieweit diese Substanzen zu symptomatischen Verbesserungen oder Verlangsamung des Krankheitsverlaufs führen, bleibt abzuwarten.

[0008] Besonders hohe Erwartungen werden an die Hemmstoffe der β - oder γ -Secretase gestellt. Diese Substanzen hemmen die Bildung des β -Amyloids, des Hauptbestandteils der neuritischen Plaques. Aufgrund unspezifischer Proteasehemmung haben bisher getestete Wirkstoffe ein hohes Nebenwirkungspotential. Darüber hinaus wird von einigen Wissenschaftlern bezweifelt, dass die Bildung von β -Amyloid die alleinige Ursache für die Alzheimer-Pathologie ist, denn die β -Amyloid-Ablagerungen korrelieren nicht mit dem Schweregrad der Krankheit und bieten keine Erklärung für die Bildung von Tau-Bündeln (neurofibrilläre Tangles = NFT).

[0009] Die bisher zur Verfügung stehenden Arzneimittel erlauben keine effektive Behandlung der Alzheimer'schen Demenz; neue therapeutische Ansätze sind daher dringend erforderlich.

[0010] Peptidasen wie die Dipeptidylpeptidase IV und die Amino-peptidase N oder ähnlich wirkende Enzyme sind für die Regulation bzw. Modulation von Wechselwirkungen zwischen Zellen besonders interessant, da sie zum Teil als Ektoenzyme in der Plasmamembran der Zellen lokalisiert sind, Interaktionen mit anderen extrazellulären Strukturen eingehen, peptiderge Botenstoffe durch enzymkatalysierte Hydrolyse aktivieren bzw. inaktivieren und dadurch wichtig für die Zell-Zell-Kommunikation sind [Yaron A, et al.: Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. Crit Rev Biochem Mol Biol 1993; 28:31-81; Vanhoof G, et al.: Proline motifs in peptides and their biological processing. FASEB J 1995;9:736-744].

[0011] Es ist gezeigt worden, dass im Prozess der Aktivierung und klonalen Expansion von Immunzellen, insbesondere von T-Lymphozyten, membranständige Peptidasen wie DP IV oder APN eine Schlüsselrolle spielen [Fleischer B: CD26 a surface protease involved in T-cell activation. Immunology Today 1994; 15:180-184; Lendeckel U et al.: Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells. International Journal of Molecular Medi-

cine 1999; 4:17–27; Riemann D et al.: CD13 – not just a marker in leukemia typing. *Immunology Today* 1999; 20:83–88]. Verschiedene Funktionen Mitogen-stimulierter mononukleärer Zellen (MNZ) oder an-gereicherter T-Lymphozyten wie DNA-Synthese, Pro-duktion und Sekretion von immunstimulierenden Zy-tokinen (IL-2, IL-6, IL-12, IFN- γ) und Helferfunktionen für B-Zellen (IgG- und IgM-Synthese) können in Ge-genwart von spezifischen Inhibitoren der DP IV oder der APN gehemmt werden [Schön E et al.: The di-peptidyl peptidase IV, a membrane enzyme involved in the proliferation of T lymphocytes. *Biomed. Bio-chim. Acta* 1985; 2: K9–K15; Schön E et al.: The role of dipeptidyl peptidase IV in human T lymphocyte ac-tivation. Inhibitors and antibodies against dipeptidyl peptidase IV suppress lymphocyte proliferation and immunoglobulin synthesis in vitro. *Eur. J. Immunol.* 1987; 17: 1821–1826; Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transfor-ming growth factor β 1 in PWM-stimulated PBMC and T cells. *Immunology* 1997; 91: 354–360; Lendeckel U et al.: Induction of the membrane alanyl ami-nopeptidase gene and surface expression in human T-cells by mitogenic activation. *Biochem. J.* 1996; 319: 817–823; Kähne T et al.: Dipeptidyl peptidase IV: A cell surface peptidase involved in regulating T cell growth (Review). *Int. J. Mol. Med.* 1999; 4: 3–15; Lendeckel U et al.: Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells (Review). *Int. J. Mol. Med.* 1999; 4: 17–27].

[0012] Es ist bereits bekannt, daß die Behandlung von Autoimmunerkrankungen und Transplantatab-stoßung durch Hemmung der auf Immunzellen loka-lisierten Dipeptidylpeptidase IV mit Hilfe von syntheti-schen Inhibitoren möglich ist (z. B. EP-A 0 764 151, WO 095/29691, EP-A 0 731 789, EP-A 0 528 858).

[0013] Der Erfindung liegt der überraschende Be-fund zugrunde, dass die einzelne oder gleichzeitige Wirkung von Inhibitoren der intraneuronalen Dipepti-dylpeptidase IV/DP IV bzw. CD26 oder von Inhibito-ren von Enzymen mit gleicher Substratspezifität (DP IV-analoge Enzymaktivität) und/oder von Inhibitoren der Aminopeptidase N/APN bzw. CD13 oder von In-hibitoren von Enzymen mit gleicher Substratspezifität (APN-analoge Enzymaktivität), die Bildung von neu-rofibrillären Tangles (NFT) verlangsamen kann.

[0014] Unsere Erfindung zeigt, dass zur Therapie und zur Prävention von insbesondere neurodegene-rativen Erkrankungen mit Ausbildung neurofibrillärer Tangles (NFT), d. h. von sogenannten Tauopathien, die einzelne oder gleichzeitige Applikation von Hemmstoffen der DP IV und der APN oder von Hemmstoffen von Enzymen gleicher Substratspezifi-tät (APN- oder/und DP IV-analoge Enzymaktivität) bzw. entsprechender Zubereitungen und Darrei-chungsformen daraus geeignet sind.

[0015] Im einzelnen liegen der Erfindung die Befun-de zugrunde, dass die Anzahl von neurofibrillären Tangles (NFT) im Hippocampus und anderen Hirnbe-reichen (z. B. Amygdala) durch die Gabe von Inhibi-toren der Dipeptidylpeptidase IV oder von Inhibitoren von Enzymen mit gleicher Substratspezifität oder/und von Inhibitoren der Aminopeptidase N oder von Inhibitoren von Enzymen mit gleicher Subst-ratspezifität signifikant reduziert wird. Besondere In-dikationsbereiche für die erfindungsgemäße Verwen-dung sind menschliche Erkrankungen mit NFT, d. h. sogenannte Tauopathien. Dazu zählen insbesonde-re, ohne die Erfindung darauf zu beschränken, Mor-bus Alzheimer, die Pick'sche Erkrankung, die pro-gressive supranukleäre Palsy, die kortikobasale De-generation und die frontotemporale Demenz. Weitere neurodegenerative Erkrankungen, bei denen mißge-faltete Proteine in charakteristischen Läsionen akku-mulieren und wesentlich zur Pathogenese und damit zum selektiven Untergang von Nervenzellen beitra-gen, sind Morbus Parkinson, Morbus Huntington und durch Prionen verursachte Erkrankungen (z. B. spon-giforme Enzephalopathie).

[0016] Die Parkinson-Krankheit wird bislang, wie bereits für Morbus Alzheimer beschrieben, aus-schließlich auf der Ebene der Symptome behandelt, d.h. praktisch häufig mit einer Kombination von Levo-dopa (Vorstufe des Transmitters der betroffenen Ner-venzellen) und Dopamin-Agonisten. Bei derartiger Medikation treten häufig unerwünschte Nebenwir-kungen in Form von Dyskinesien (Blockaden) auf. Darüber hinaus nutzt sich nach einigen Jahren der Effekt stark ab. Wie auch für Morbus Alzheimer gilt, daß bislang noch keine an der Pathogenese anset-zende, d.h. auf die Ursachen der Erkrankung einwir-kende Therapieform existiert.

[0017] Der Körper reagiert auf verschiedenste He-rauforderungen mit Inflammation, ein Vorgang, der gefährliche Agenzien beseitigen und ihre schädliche Wirkung beseitigen soll. Im Verlauf von neurodege-nativen Erkrankungen wird Inflammation vermut-lich durch die abnormale Akkumulation missgefalte-ter Proteine und/oder Signale von pathologisch ver-änderten Neuronen ausgelöst. Veränderte Expressi-on der an diesen inflammatorischen Prozessen betei-ligten Faktoren kann die neurodegenerative Erkran-kung sowohl befördern als auch ihr entgegenwirken (Wyss-Coray, T and Mucke, L: Inflammation in Neu-rodegenerative disease – a double – edged sword. *Neuron* 2002; 35:419–432). Da also Inflammation durchaus positive, neuroprotektive Aspekte hat, er-scheint eine Lenkung bzw. gezielte Elimination der negativen Aspekte ein besserer therapeutischer An-satz als derjenige, Inflammation grundsätzlich zu un-terdrücken.

[0018] Durch eine kombinierte Inhibition der Dipep-tidylpeptidase IV und der Aminopeptidase N konnten

bereits erste Hinweise auf eine positive Modulation der Inflammation in Reaktion auf Neurodegeneration erhalten werden. Nach einer fokalen Ischämie im Tiermodell verringerte sich durch kombinierte DP IV/APN Inhibition das Infarktvolumen (bislang unveröffentlichte Ergebnisse). In hippokampalen organotypischen Schnittkulturen kann durch Inflammation eine Degeneration des Gewebes, wobei auch die Neurone untergehen, ausgelöst werden. Diese Degeneration hängt von aktivierter Mikroglia ab, die bei inflammatorischen Prozessen im Gehirn eine entscheidende Rolle spielt. Auch hier konnte die Degeneration des Nervengewebes durch eine kombinierte Inhibition von DP IV/APN verringert werden, was auf eine Eindämmung/Modulation der Inflammation schließen lässt. Der genaue Mechanismus dieser Protektion ist aber noch nicht verstanden und wird zur Zeit genauer untersucht. Nichtsdestotrotz kann aber bereits festgestellt werden, dass deutliche Anzeichen für eine Modulation der Inflamationsreaktion in einer Art und Weise vorhanden sind, die eine fortschreitende, sich selbst perpetuierende Degeneration von Nervengewebe unterbricht. Damit bleiben degenerative Prozesse auf die primären Ursachen beschränkt; eine Beschleunigung/Ausbreitung der Degeneration durch Inflammation wird verhindert. Diese deutliche Verlangsamung der Pathogenese könnte auch beim Patienten zu einer deutlichen Verbesserung der Symptomatik vor allem in frühen bis mittleren Stadien der Erkrankung führen, bzw. die späteren Stadien, die durch vollständige Pflegeabhängigkeit charakterisiert sind, möglicherweise um Jahre verzögern.

[0019] Der Einsatz von DP IV- oder/und APN-Inhibitoren würde bei den genannten Erkrankungen vor allem in den frühen Stadien eine gänzlich neuartige, vorraussichtlich sehr effektive, möglicherweise kostengünstige Therapieform und einen wertvollen alternativen Bestandteil der bestehenden Therapiekonzepte darstellen.

[0020] Die erfindungsgemäß applizierten Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV oder Inhibitoren von Enzymen mit gleicher Substratspezifität (DP IV-analoge Enzymaktivität) oder/und Inhibitoren der Amino-peptidase N oder Inhibitoren von Enzymen gleicher Substratspezifität (APN-analoge Enzymaktivität) können in pharmazeutisch anwendbaren Formulierungskomplexen als Inhibitoren, Substrate, Pseudosubstrate, inhibitorisch wirkende Peptide und Peptid-derivate sowie als Antikörper dieser Enzyme zur Anwendung kommen. Die Inhibitoren gemäß der Erfindung werden allein oder in Kombination von mehreren von ihnen, vorzugsweise in Kombination von zweien von ihnen, eingesetzt.

[0021] Bevorzugte Effektoren sind für die DP IV Xaa-Pro-Dipeptide, entsprechende Derivate, vorzugsweise Dipeptidphosphonsäurediarylester, Di-

peptidboronsäuren (z. B. Pro-boro-Pro) und deren Salze, Xaa-Xaa-(Trp)-Pro-(Xaa)n-Peptide (n = 0 bis 10), entsprechende Derivate und deren Salze bzw. Aminosäure (Xaa)-amide, entsprechende Derivate und deren Salze, wobei Xaa eine α -Aminosäure/Iminosäure bzw. ein α -Aminosäurederivat/Iminosäurederivat, vorzugsweise N⁴-4-Nitrobenzyl-oxycarbonyl-L-Lysin, L-Prolin, L-Tryptophan, L-Isoleucin, L-Valin ist und als Amidstruktur cyclische Amine, z. B. Pyrrolidin, Piperidin, Thiazolidin und deren Derivate fungieren. Derartige Verbindungen und deren Herstellung wurden in einem früheren Patent beschrieben (K. Neubert et al. DD296075A5). Weiter können als Effektoren für die DP IV mit Vorteil Tryptophan-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-3-carbonsäure-derivate (TSL) und (2S,2S',2S'')-2-[2'-(2"-amino-3"-[indol-3"-yl)-1"-oxopropyl]-1',2',3',4'-tetrahydro-6'8'-dihydroxy-7-methoxyisochinol-3-yl-carbonyl-amino]-4-hydromethyl-5-hydropentansäure (TMC-2A) verwendet werden. Ein beispielhafter, mit Vorteil verwendbarer Inhibitor von DP IV ist Lys[Z(NO₂)-thiazolidid, worin Lys für einen L-Lysin-Rest steht und Z(NO₂) für 4-Nitrobenzyloxycarbonyl steht (vgl. DD-A 296075).

[0022] Als Inhibitoren der Alanyl-aminopeptidase (Amino-peptidase N, APN) kommen erfindungsgemäß beispielsweise Actinonin, Leuhistin, Phebestin, Amastatin, Bestatin, Probestin, β -Aminothiole, α -Aminophosphinsäuren, α -Aminophosphinsäure-derivate, vorzugsweise D-Phe- ψ -PO(OH)-CH₂-Phe-Phe und deren Salze in Betracht. Bevorzugte Inhibitoren für die Alanyl-Amino-peptidase sind Bestatin (Ubenimex), Actinonin, Probestin, Phebestin, RB3014 oder Leuhistin.

[0023] Die Inhibitoren oder diese enthaltende pharmazeutische Zubereitungen werden simultan mit bekannten Trägerstoffen verabreicht. Von der Erfindung umfaßt sind auch pharmazeutische Zubereitungen, die zwei oder mehrere der Inhibitoren der DP IV bzw. Inhibitoren von Enzymen mit DP IV-analoger Enzymaktivität oder/und der APN bzw. Inhibitoren von Enzymen mit APN-analoger Enzymaktivität in räumlich getrennter Formulierung in Kombination mit an sich bekannten Träger-, Hilfs- und/oder Zusatzstoffen zur gleichzeitigen oder zeitlich unmittelbar aufeinanderfolgenden Verabreichung mit dem Ziel einer gemeinsamen Wirkung umfassen.

[0024] Die Verabreichung erfolgt einerseits als topische Applikation in Form von z.B. Cremes, Salben, Pasten, Gelen, Lösungen, Sprays, Liposomen und Nanosomen, Schüttelmixturen, "pegylierten" Formulierungen, degradierbaren (d. h. unter physiologischen Bedingungen abbaubaren) Depot-Matrices, Hydrokolloidverbänden, Pflastern, Mikroschwämmen, Prepolymeren und ähnlichen neuen Träger-substraten, Jet-Injektion bzw. anderen dermatologischen Grundlagen/Vehikeln einschließlich instillativer

Applikation, und andererseits als systemische Applikation zur oralen, transdermalen, intravenösen, subcutanen, intracutanen, intramuskulären Anwendung in geeigneten Rezepturen bzw. in geeigneter Galenik.

[0025] Der/die Inhibitor(en) gemäß der Erfindung sowie Zubereitungen, die einen oder mehrere von den genannten Inhibitoren und gegebenenfalls noch weitere Komponenten wie weitere Inhibitoren, sowie pharmazeutisch verträgliche Zusatz-, Hilfs- oder Trägerstoffe enthalten, kommen bei einer ganzen Anzahl von Demenzerkrankungen bzw. Zuständen mit Bildung neurofibrillärer Tangles (NFT), sogenannten Tauopathien, und anderen Erkrankungen mit abnormalen Proteinakkumulationen vorbeugend oder therapierend zur Anwendung.

[0026] Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Therapie und Prävention von neurodegenerativen Erkrankungen, deren Pathogenese inflammationsabhängig verläuft (siehe oben). So können beispielhaft genannt werden: Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Morbus Huntington, die von Prionen verursachten Erkrankungen und weitere Tauopathien wie die Pick'sche Erkrankung, die progressive supranukleäre Palsy, die kortikobasale Degeneration und die frontotemporalen Demenz. Dabei umfaßt das Verfahren die Verabreichung von Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) sowie von Inhibitoren von Enzymen mit gleicher Substratspezifität (DP IV-analoge Enzymaktivität) oder/und von Inhibitoren der Alanin-Aminopeptidase (Aminopeptidase N, APN) sowie von Inhibitoren von Enzymen gleicher Substratspezifität (APN-analoge Enzymaktivität) an einen Patienten, der zur Prävention und/oder Therapie der oben genannten Erkrankungen oder Zustände einer Behandlung bedarf.

[0027] In besonders bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung werden an einen unter einer oder mehreren der nachfolgend im einzelnen genannten Erkrankungen oder Zustände leidenden oder einer Prävention der nachfolgend genannten Krankheiten oder Zustände bedürftenden Patienten ein Inhibitor oder mehrere Inhibitoren der genannten Enzyme oder eine oder mehrere, diese Inhibitoren einzeln oder bevorzugt in Kombination enthaltende pharmazeutische Zubereitungen verabreicht, die gewählt sind aus Inhibitoren der DP IV und besonders bevorzugt aus Xaa-Pro-Dipeptiden (Xaa = α -Aminosäure bzw. seitenkettengeschütztes Derivat), entsprechenden Derivaten, vorzugsweise Dipeptidphosphonsäurediarylestern, Dipeptidboronsäuren (z.B. Pro-boro-Pro) und deren Salzen, Xaa-Xaa-(Trp)-Pro-(Xaa)_n-Peptiden (Xaa = α -Aminosäure, n = 0 bis 10), entsprechenden Derivaten und deren Salzen, Aminosäure (Xaa)-amiden, entsprechende Derivaten und deren Salzen, wobei Xaa eine α -Aminosäure bzw. ein seitenkettengeschütztes De-

rivat, vorzugsweise N⁴-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin, L-Isoleucin, L-Valin, L-Tryptophan, L-Prolin, ist und als Amidstruktur cyclische Amine, z.B. Pyrrolidin, Piperidin, Thiazolidin und deren Derivate fungieren, und/oder Tryptophan-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-3-carbonsäure-derivate (TSL) und (2S,2S',2S'')-2-[2'-(2"-amino-3"-(indol-3"-yl)-1"-oxopropyl)-1',2',3',4'-tetrahydro-6'8'-dihydroxy-7-methoxyisochinolin-3-yl-carbonyl-amino]-4-hydromethyl-5-hydropentansäure (TMC-2A), und Inhibitoren der APN, besonders bevorzugt Actinonin, Leuhistin, Phebestin, Amastatin, Bestatin, Probestin, β -Aminothiolen, α -Aminophosphinsäuren, α -Aminophosphinsäurederivaten, vorzugsweise D- ψ -Phe-PO(OH)-CH₂-Phe-Phe, und deren Salzen.

[0028] In weiteren bevorzugten Verfahren gemäß der Erfindung kommen die Inhibitoren und gegebenenfalls ihre Kombinationen und diese enthaltende pharmazeutische Zubereitungen zur Anwendung bei der Prävention und Therapie von Erkrankungen und bzw. Zuständen mit Bildung neurofibrillärer Tangles (NFT) und anderer abnormaler Proteinakkumulationen. Beispielhaft können genannt werden eine Vorbeugung und Therapie von Morbus Alzheimer, der Pick'schen Erkrankung, der progressiven supranukleären Palsy, der kortikobasalen Degeneration, der frontotemporalen Demenz, von Morbus Parkinson, Morbus Huntington und von durch Prionen bedingten Erkrankungen

[0029] In erfindungsgemäß besonders bevorzugten Präventions- und/oder Therapieverfahren werden einer oder mehrere der genannten Inhibitoren der DP IV und/oder APN in der Weise zur Anwendung gebracht, daß zwei oder mehrere der Inhibitoren der DP IV bzw. Inhibitoren von Enzymen mit DP IV-analoger Enzymaktivität oder/und Inhibitoren der APN bzw. Inhibitoren von Enzymen mit APN-analoger Enzymaktivität in räumlich getrennter Formulierung in Kombination mit an sich bekannten Träger-, Hilfs- und/oder Zusatzstoffen gleichzeitig oder zeitlich unmittelbar aufeinander folgend mit dem Ziel einer gemeinsamen Wirkung verabreicht werden. Die Verabreichung erfolgt als systemische Anwendung zur oralen, transdermalen, percutanen, intravenösen, subcutanen, intracutanen, intramuskulären, rektalen, vaginalen, sublingualen Applikation zusammen mit an sich bekannten Träger-, Hilfs- und/oder Zusatzstoffen und/oder als topische Anwendung in Form von Cremes, Salben, Pasten, Gelen, Lösungen, Sprays, Liposomen bzw. Nanosomen, "pegylierten" Formulierungen, degradierbaren Depot-Matrices, Schüttelmixturen, Hydrokolloidverbänden, Pflastern, Mikroschwämmen, Prepolymeren und ähnlichen neuen Trägersubstraten, Jet-Injektionen bzw. anderen dermatologischen Grundlagen/Vehikeln, einschließlich instillativer Applikation.

[0030] Die Erfindung wird anhand der nachfolgen-

don Beispiele näher erläutert. Die Beispiele zeigen bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung. Die Erfindung ist jedoch nicht auf die bevorzugten Ausführungsformen beschränkt.

Ausführungsbeispiel

[0031] Transgene Mäuse, die das humane Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau mit der Mutation P301L unter der Kontrolle des Maus Prion-Promotors exprimieren, entwickeln altersabhängig neurofibrilläre Tangles (NFT), Neurodegeneration und Defizite im Bewegungsapparat verbunden mit Verhaltensbeeinträchtigungen (Lewis J, McGowan E, Rockwood J, Melrose H, Nacharaju P, Van Slegtenhorst M, Gwinn-Hardy K, Paul Murphy M, Baker M, Yu X, Duff K, Hardy J, Corral A, Lin WL, Yen SH, Dickson DW, Davies P, Hutton M. Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301 L) tau protein. *Nat Genet.* 2000, 25(4), 402 – 405). Sie können deshalb als ein vollständiges Modell für die Pathogenese menschlicher Erkrankungen mit NFT, den sogenannten Tauopathien, angesehen werden.

[0032] Die ursprüngliche JNPL3 Mauslinie wurden mit B6D2F1 Hybriden gekreuzt erworben (Taconic; Germantown; USA) und die hemizygote F1 entwickelte nach ca. 6 Monaten erste Symptome von sich entwickelnden Bewegungs- und Verhaltenstörungen. Die betroffenen Mäuse waren nicht mehr in der Lage, bei Aufnahme am Schwanz als Fluchtreaktion die Extremitäten zu spreizen, sondern zeigten im Gegenteil spontane Verkrampfungen der Hinterbeine. Nach 10 Monaten zeigten über 90% der Tau-transgenen Mäuse Schwierigkeiten beim Aufrichten und in Hängetests konnte eine angebotene Leine nur noch mit Mühe ergriffen werden, so dass ein Anklammern häufig misslang.

[0033] Auf zellulärer Ebene korrelierten damit neuropathologische Veränderungen, deren auffälligste die Bildung von NFT unter anderem im Rückenmark waren. Diese konnten durch Congorot und Thioflavin-S Fluoreszenzmikroskopie sowie Gallyas Silberfärbungen nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte eine somatodendritische, „pre-tangle“-Tau Akkumulation in weiteren Hirnregionen, speziell im Entorhinalen Kortex sowie im Hippokampus nachgewiesen werden.

[0034] Um die NFT-Bildung auch in diesen Bereichen zu beschleunigen wurden 6 bis 7 Monate alten transgenen Mäusen fibrilläres Abeta 1-42 in den entorhinalen Kortex oder den Hippokampus stereotaktisch injiziert. Dieses sorgte, je nach Injektionsstelle, für die robuste Ausbildung von NFT-Pathologie im Hippokampus bzw. der Amygdala von transgenen, nicht aber Wildtyp-Kontrolltieren, innerhalb von 2 bis 3 Wochen.

[0035] Während dieser Zeit wurde den Tieren alle 2 bis 3 Tage eine Kombination von Inhibitoren gegen DPP IV (1-49) und APN (Bestatinhydrochlorid; Actinonin) in einer Konzentration von 5 bis 10 mg/kg Körpergewicht durch i.p. Injektionen verabreicht. Darüber hinaus wurden beide Inhibitoren jeweils auch einzeln bis zu einer Konzentration von 50 mg/kg Körpergewicht getestet.

[0036] Durch die stereotaktische Injektion von fibrillärem Abeta in den entorhinalen Kortex der einen Hemisphere und den Hippocampus der kontralateralen Hemisphere kann davon ausgegangen werden, dass Amyloid-Fibrillen noch mindestens 45 Tage nach der Injektion im Gewebe vorhanden sind (Götz J, Chen F, van Dorpe J, Nitsch RM. Formation of neurofibrillary tangles in P301 L tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science* 2001, 293(5534), 1491-5.). NFT bildeten sich jeweils in Zellkörpern, deren Axone zu den Injektionsstellen projizierten, also dem Hippocampus bzw. der Amygdala.

[0037] Die Anzahl der NFT konnte durch die Gabe sowohl von Inhibitoren der DPP IV als auch von Inhibitoren der APN in beiden Hirnarealen signifikant gesenkt werden. Durch die Kombination beider Inhibitoren ergab sich darüber hinaus eine bessere NFT-Protektion als für jeden einzelnen Inhibitor beobachtet, was für eine über der Addition der Effekte liegende Wirkung der Kombination der einzelnen Inhibitoren spricht.

[0038] Gallyas-positive NFT wurden wie in Götz et al. (a. a. O.) beschrieben ausgewertet. Dazu wurden serielle frontale Schnitte durch das Hirn angefertigt und jeder 5. Schnitt in der Nähe der Injektionsstelle wurde nach Gallyas-Färbung analysiert. Gallyas-positive NFT wurden auf 20 standardisierten Schnitten gezählt und aufaddiert. Mittelwert und Standardabweichung wurden für jeweils drei Mäuse ermittelt.

[0039] Darüber hinaus ergab sich auch eine Verbesserung des allgemeinen Zustandes der Versuchstiere. So setzten die Defizite des Bewegungsapparates im Beobachtungszeitraum nicht oder nur so abgeschwächt ein, dass die normale Fluchtreaktion durch Extension der Hinterbeine kaum beeinträchtigt wurde. Auch eine zusammengekauerte Haltung mit verkrampften Pfoten als Sitzposition wurde nur selten beobachtet. Auch nicht indirekt mit dem Bewegungsapparat zusammenhängende Parameter konnten als verbessert angesehen werden. Mit DPP IV-/APN-Inhibitoren behandelte Tiere verloren nicht an Gewicht und zeigten kaum beeinträchtigtes Putzverhalten.

[0040] Zusammenfassend konnte also eine gute Korrelation im Rückgang der Neuropathologie, im Besonderen der NFT-Bildung, mit einer Verbesserung des Zustandes der Mäuse beobachtet werden. Das Ausbleiben der Verhaltensdefizite hing jedoch

vermutlich nicht oder nur indirekt mit der Reduktion der NFT-Bildung in den analysierten Hirnregionen zusammen. Eine Korrelation der Verhaltensabnormalitäten mit der bereits beschriebenen NFT-Pathologie und damit einhergehenden Neurodegeneration, insbesondere im Rückenmark und im Hirnstammbe- reich (Lewis et al., a. a. O.) kann jedoch als sehr wahrscheinlich angesehen werden. Somit wären auch die Verbesserungen in der Verhaltenssymptomatik entweder auf eine Protektion der Nervenzellen durch die getestete Wirkstoffkombination oder zumin- dest eine Verlangsamung der Pathogenese zurück- zuführen.

Patentansprüche

1. Verwendung von Inhibitoren der Dipeptidyl- peptidase IV (DP IV) sowie von Inhibitoren von Enzy- men mit gleicher Substratspezifität (DP IV-analoge Enzymaktivität) oder/und von Inhibitoren der Ala- nyl-Amino-peptidase (Amino-peptidase N, APN) sowie von Inhibitoren von Enzymen gleicher Substratspezi- fität (APN-analoge Enzymaktivität) zur Reduktion neurodegenerativer Läsionen, die durch die Bildung von Aggregaten mißgefalteter Proteine (wie NFT) ausgelöst werden, und zur Eindämmung/Modulation von Inflammation, die diese Läsionen beschleunigt.

2. Verwendung nach Anspruch 1, worin die Inhi- bitoren der DP IV Xaa-Pro-Dipeptide (Xaa = α -Amino- säure bzw. seitenkettengeschütztes Derivat), ent- sprechende Derivate, vorzugsweise Dipeptidphos- phonsäurediarylester, Dipeptidboronsäuren (z.B. Pro-boro-Pro) und deren Salze, Xaa-Xaa-(Trp)-Pro-(Xaa)n-Peptide (Xaa = α -Amino- säure, n = 0 bis 10), entsprechende Derivate und de- ren Salze, Aminosäure (Xaa)-amide, entsprechende Derivate und deren Salze, wobei Xaa eine α -Amino- säure bzw. ein seitenkettengeschütztes Derivat, vor- zugsweise N⁴-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin, L-Isoleucin, L-Valin, L-Tryptophan, L-Prolin, ist und als Amidstruktur cyclische Amine, z.B. Pyrrolidin, Pi- peridin, Thiazolidin und deren Derivate fungieren, und/oder Tryptophan-1,2,3,4-tetrahydroisochino- lin-3-carbonsäurederivate (TSL) und (2S,2S',2S'')-2-[2'-[2"-amino-3"-(indol-3"-yl)-1"-oxo- propyl]-1',2',3',4'-tetrahydro-6'8'-dihydroxy-7-metho- xyisochinol-3-yl-carbonyl-amino]-4-hydrome- thyl-5-hydropentansäure (TMC-2A) sind.

3. Verwendung nach Anspruch 1, worin Amino- säureamide, bevorzugt N⁴-4-Nitrobenzyloxycarbo- nyl-L-Lysin-thiazolidid, -pyrrolidid und -piperidid so- wie das entsprechende 2-Cyanothiazolidid-, 2-Cya- nopyrrolidid- und 2-Cyanopiperididderivat, als DP IV-Inhibitoren eingesetzt werden.

4. Verwendung nach Anspruch 1, wobei als Inhi- bitoren der APN Actinonin, Leuhistin, Phebestin, Amastatin, Bestatin, Probestin, β -Aminothiole,

α -Aminophosphinsäuren, α -Aminophosphinsäure- derivate, vorzugsweise D- ψ -Phe-PO(OH)-CH₂-Phe-Phe, und deren Salze fungieren.

5. Verwendung von Inhibitorkombinationen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Vorbeugung und Therapie von Morbus Alzheimer, der Pick'schen Er- krankung, der Progressiven Supranukleären Palsy, der kortikobasalen Degeneration, der frontotempora- len Demenz, von Morbus Parkinson, insbesondere Parkinsonismus gekoppelt an das Chromosom 17, von Morbus Huntington und von durch Prionen be- dingten Krankheitszuständen.

6. Pharmazeutische Zubereitungen, umfassend Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) oder Inhibitoren von Enzymen mit DP IV-analoger Enzym- aktivität oder/und Inhibitoren der Alanyl-Amino-pepti- dase (Amino-peptidase N, APN) oder Inhibitoren von Enzymen mit APN-analoger Enzymaktivität in Kombi- nation mit an sich bekannten Träger-, Zusatz- und/oder Hilfsstoffen.

7. Pharmazeutische Zubereitungen nach An- spruch 6, umfassend als Inhibitoren der DP IV Xaa-Pro-Dipeptide (Xaa = α -Aminosäure bzw. seiten- ketten-geschützte Derivate), entsprechende Deriva- te, vorzugsweise Dipeptidphosphonsäurediarylester, Dipeptidboronsäuren (z. B. Pro-boro-Pro) und deren Salze, Xaa-Xaa-(Trp)-Pro-(Xaa)n-Peptide (Xaa = α -Aminosäuren, n = 0–10), entsprechende Derivate und deren Salze bzw. Aminosäure (Xaa)-amide, ent- sprechende Derivate und deren Salze, wobei Xaa eine α -Aminosäure bzw. seitenkettengeschütztes Derivat, vorzugsweise N⁴-4-Nitrobenzyloxycarbo- nyl-L-Lysin, L-Isoleucin, L-Valin, L-Tryptophan, L-Prolin ist und als Amidstruktur cyclische Amine, z.B. Pyrrolidin, Piperidin, Thiazolidin und deren Deri- vate fungieren.

8. Pharmazeutische Zubereitungen nach An- spruch 6, umfassend als Inhibitoren der DP IV vor- zugsweise Aminosäureamide, z.B. N⁴-4-Nitrobenzy- loxycarbonyl-L-Lysin-thiazolidid, -pyrrolidid und -pi- peridid sowie das entsprechende 2-Cyanothiazoli- did-, 2-Cyanopyrrolidid- und 2-Cyanopiperididderivat.

9. Pharmazeutische Zubereitungen nach An- spruch 6, umfassend als Inhibitoren der APN Actino- nin, Leuhistin, Phebestin, Amastatin, Bestatin, Pro- bestin, β -Aminothiole, α -Aminophosphinsäuren, α -Aminophosphinsäurederivate, bevorzugt D-Phe- ψ [PO(OH)-CH₂]-Phe-Phe und deren Salze.

10. Pharmazeutische Zubereitungen nach einem der Ansprüche 6 bis 9, umfassend zwei oder mehrere der Inhibitoren der DP IV bzw. Inhibitoren von Enzy- men mit DP IV-analoger Enzymaktivität oder/und In- hitatoren der APN bzw. Inhibitoren von Enzymen mit

APN-analoger Enzymaktivität in räumlich getrennter Formulierung in Kombination mit an sich bekannten Träger-, Hilfs- und/oder Zusatzstoffen zur gleichzeitigen oder zeitlich unmittelbar aufeinanderfolgenden Verabreichung mit dem Ziel einer gemeinsamen Wirkung.

11. Pharmazeutische Zubereitungen gemäß Ansprüchen 6 bis 9 für die systemische Anwendung zur oralen, transdermalen, percutanen, intravenösen, subcutanen, intracutanen, intramuskulären, rektalen, vaginalen, sublingualen Applikation zusammen mit an sich bekannten Träger-, Hilfs- und/oder Zusatzstoffen.

12. Pharmazeutische Zubereitungen gemäß Ansprüchen 6 bis 10 für die topische Anwendung in Form von Cremes, Salben, Pasten, Gelen, Lösungen, Sprays, Liposomen bzw. Nanosomen, "pegylierten" Formulierungen, degradierbaren Depot-Matrices, Schüttelmixturen, Hydrokolloidverbänden, Pflastern, Mikroschwämmen, Prepolyomeren und ähnlichen neuen Trägersubstraten, Jet-Injektionen bzw. anderen dermatologischen Grundlagen/Vehikeln, einschließlich instillativer Applikation.

13. Verfahren zur Therapie und Prävention von Demenzerkrankungen oder -Zuständen, umfassend die Verabreichung von Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) sowie von Inhibitoren von Enzymen mit gleicher Substratspezifität (DP IV-analoge Enzymaktivität) oder/und von Inhibitoren der Alanin-Aminopeptidase (Aminopeptidase N, APN) sowie von Inhibitoren von Enzymen gleicher Substratspezifität (APN-analoge Enzymaktivität).

14. Verfahren zur Therapie und Prävention von Erkrankungen und Zuständen, die bedingt sind durch die Bildung von Aggregaten mißgefalteter Proteine und/oder eine damit verbundene, neurodegenerative Läsionen beschleunigende Inflammation, umfassend die Verabreichung von Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) sowie von Inhibitoren von Enzymen mit gleicher Substratspezifität (DP IV-analoge Enzymaktivität) oder/und von Inhibitoren der Alanin-Aminopeptidase (Aminopeptidase N, APN) sowie von Inhibitoren von Enzymen gleicher Substratspezifität (APN-analoge Enzymaktivität).

15. Verfahren nach Anspruch 13 oder Anspruch 14, worin ein Inhibitor oder mehrere Inhibitoren der genannten Enzyme oder eine oder mehrere, diese Inhibitoren einzeln oder bevorzugt in Kombination enthaltende pharmazeutische Zubereitungen an einen Patienten verabreicht werden, die gewählt sind aus Inhibitoren der DP IV und besonders bevorzugt aus Xaa-Pro-Dipeptiden (Xaa = α -Aminosäure bzw. seitenkettengeschütztes Derivat), entsprechenden Derivaten, vorzugsweise Dipeptidphosphonsäurediarylethern, Dipeptidboronsäuren (z.B. Pro-boro-Pro) und

deren Salzen, Xaa-Xaa-(Trp)-Pro-(Xaa)_n-Peptiden (Xaa = α -Aminosäure, n = 0 bis 10), entsprechenden Derivaten und deren Salzen, Aminosäure (Xaa)-amiden, entsprechende Derivaten und deren Salzen, wobei Xaa eine α -Aminosäure bzw. ein seitenkettengeschütztes Derivat, vorzugsweise N⁴-Nitrobenzylloxycarbonyl-L-Lysin, L-Isoleucin, L-Valin, L-Tryptophan, L-Prolin, ist und als Amidstruktur cyclische Amine, z.B. Pyrrolidin, Piperidin, Thiazolidin und deren Derivate fungieren, und/oder Tryptophan-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-3-carbonsäure-derivate (TSL) und (2S,2S',2S'')-2-[2'-(2"-amino-3"-indol-3"-yl)-1"-oxopropyl]-1',2',3',4'-tetrahydro-6'8'-dihydroxy-7-methoxyisochinolin-3-yl-carbonyl-amino]-4-hydromethyl-5-hydropentansäure (TMC-2A), und Inhibitoren der APN, besonders bevorzugt Actinonin, Leuhistin, Phebestin, Amastatin, Bestatin, Probestin, β -Aminothiolen, α -Aminophosphonsäuren, α -Aminophosphinsäurederivaten, vorzugsweise D- ψ -Phe-PO(OH)-CH₂-Phe-Phe, und deren Salzen.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Figur 1:

**Derzeit auf dem Markt befindliche Produkte zur Behandlung der
Alzheimer'schen Krankheit ¹**

Brand Name / Generic Code	Drug Class	Launch Date	Market Share [in %]	Strengths	Weaknesses
*Aricept / donepezil	Acetylcholin- esterase Inhibitor	1997	72.1	<ul style="list-style-type: none"> • Status as a "gold-standard" • Once-a-day dosing • No liver toxicity 	<ul style="list-style-type: none"> • Some mild side-effects including headache, pain, fatigue, nausea, insomnia, etc.
*Exelon / rivastigmine	Acetylcholin- esterase Inhibitor	2000	17.3	<ul style="list-style-type: none"> • More potent inhibitor of AChE in the cortex and hippocampus • few side effects • No known drug interactions 	<ul style="list-style-type: none"> • Twice-daily dosing regimen • Some patients in clinical trials who received higher doses died
*Reminyl / galantamine	Acetylcholin- esterase Inhibitor	2001	9.8	<ul style="list-style-type: none"> • Dual mechanism of action to maximize cholinergic function 	<ul style="list-style-type: none"> • Conclusive evidence of its potential benefit has not yet been proven)
AXURA (Eblxa) /Memantine	NMDA receptor antagonist	2002 (EU) Phase III (USA)		<ul style="list-style-type: none"> • Approved for medium severe AD 	<ul style="list-style-type: none"> • no causal treatment

Drugs in development					
Aizhemed	anti- β -amyloid aggregation compound	Phase II clinical trials		<ul style="list-style-type: none"> potentially disease-modifying treatment 	<ul style="list-style-type: none"> clinical effectiveness not yet proven
Lipitor Atorvastatin	statins (HMG-CoA reductase inhibitors) lipid lowering agent	Phase II clinical trials		<ul style="list-style-type: none"> good safety profile of other broadly used statins epidemiological evidence that statin users have lower prevalence of AD 	<ul style="list-style-type: none"> mechanism unknown
Ampalex	AMPAkine facilitates Glutamate effect at AMPA receptors	Phase II clinical trials		<ul style="list-style-type: none"> 	<ul style="list-style-type: none"> effect not yet proven
Neo Trofin	neurotrophic agent induces production of neurotrophins	Phase II/III clinical trials		<ul style="list-style-type: none"> 	<ul style="list-style-type: none"> effect not yet proven
	β -Secretase and γ -Secretase inhibitors	Pre-clinical phase		<ul style="list-style-type: none"> potential for disease modifying activity 	<ul style="list-style-type: none"> inhibition of physiologically important proteases (notch) based on β-amyloid hypothesis alone

¹ Quelle: Therapeutic Report Series: The CNS Outlook 2007, Reuters Business Insight, 2002; Nervous Breakdown, a Detailed Analysis of the Neurology Market, UBS Global Equity Research, 2001